



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO:LIPOSOMAS PARA EL
TRATAMIENTO DEL CARCINOMA
HEPÁTICO

Autor: Marina Pérez Aranaga

D.N.I.: 48746163-D

Tutor: Ana Isabel Torres

Convocatoria: 23 Junio

LIPOSOMAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CARCINOMA HEPÁTICO

RESUMEN

Ante la alta prevalencia del carcinoma hepático que encontramos actualmente y la dificultad de tratarlo por la gran resistencia a los distintos agentes terapéuticos que presenta el hígado, debido a la rápida eliminación que es capaz de llevar a cabo, se han propuesto numerosas técnicas con el fin de mejorar esta situación. Entre ellas se encuentra la incorporación del citostático en el interior de una nanopartícula lipídica que mejora las características farmacocinéticas del fármaco así como vectorizar estas partículas con el fin de reducir los efectos adversos comunes de este tipo de tratamiento.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma hepático es el principal cáncer primario de hígado. Este tipo de cáncer es el quinto más común en todo el mundo y el tercero que más mortalidad provoca. El aumento de la prevalencia de las hepatitis B y C, del alcoholismo y del hígado graso debido al aumento de obesidad, hace pensar en el incremento de la incidencia del hepatocarcinoma en un futuro próximo. Se estima que los nuevos casos se encontrarán entre 500.000 – 1.000.000 al año produciéndose 600.000 muertes cada año (1). No es el más común pero sí de los más agresivos y de los que produce mayor morbi-mortalidad debido en gran medida a su tardía detección.

La distribución del hepatocarcinoma varía según la zona geográfica, siendo mayor la prevalencia en zonas donde la hepatitis B es endémica, como en África subsahariana y Asia del Este, con más de 20 casos por cada 100.000 personas. En países mediterráneos como España, Italia y Grecia, las tasas de incidencia se encuentran entre 10-20 por 100.000 personas, mientras que América tanto Norte como Sur la incidencia es relativamente baja; menos de 5 por cada 100.000 habitantes (2). La distribución por edad está relacionada con la hepatitis viral dominante en la población subyacente y a la edad a la que se adquirió. Este cáncer es más común en hombres que en mujeres al igual que VHB, VHC, y el consumo de alcohol son más frecuentes y posiblemente más cancerígenos en los hombres. En el 80-90% de los casos, el hepatocarcinoma se produce en el contexto de cirrosis (3).

La etiología vírica y química, así como los mecanismos moleculares de la patogenia del hepatocarcinoma sigue siendo en gran parte desconocido. Estudios recientes han identificado varios factores potenciales que pueden contribuir a la patogénesis de éste, considerándose, por tanto, factores de riesgo (4). En primer lugar, el virus de la hepatitis B, principal factor de

riesgo que representa el 50% de los casos de carcinoma hepático. En las zonas endémicas, el VHB se adquiere principalmente por transmisión vertical y perinatal, y más del 90% de estos casos, se convierten en portadores crónicos de VHB. Por el contrario, las zonas de baja prevalencia, como los países occidentales, que suele adquirirse en la edad adulta por transmisión horizontal (a través de la vía sexual o parenteral) pero más del 90% de las infecciones agudas se resuelven de forma espontánea. El VHB es una causa del hepatocarcinoma en ausencia de cirrosis; a pesar de ello, la mayoría de personas que padecen carcinoma hepático relacionado con hepatitis B presentan también cirrosis (70% -90%).

En segundo lugar, el virus de la hepatitis C. Estudios prospectivos demostraron el mayor riesgo de padecer hepatocarcinoma en personas que presentaban VHC (5). Además, un estudio de casos y controles también llegó a la misma conclusión, afirmando que los individuos con VHC tenían 17 veces más probabilidad de padecer cáncer hepático (6).

En tercer lugar, encontramos las aflatoxinas. Hay una alta incidencia de carcinoma hepatocelular en las regiones donde la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas es común, como en algunas partes de África subsahariana y Asia oriental. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas regiones presentan también una alta prevalencia del VHB. En la mayoría de los casos de cáncer en estas regiones, se encontró que presentaban la mutación del gen p53, supresor de tumores que se debe muy probablemente a aflatoxinas (7). A pesar de que no hay evidencia de casos relacionados con aflatoxinas en los EE.UU si existe un estudio de China, el cual demostró que existe, aproximadamente, 60 veces más riesgo de hepatocarcinoma en pacientes con infección crónica por VHB y exposición a aflatoxinas (8).

También el alcohol se ha estudiado como posible factor de riesgo, pero a pesar de que el consumo excesivo de alcohol aumenta el riesgo de carcinoma hepatocelular a través de la cirrosis, no hay pruebas concluyentes para demostrar el potencial carcinogénico del alcohol. Éste actúa en sinergia con el virus de la hepatitis B y C, acelerando el proceso de fibrosis y la progresión a cirrosis. Un estudio mostro que en paciente con VHC crónica tenían mayor probabilidad de desarrollar cáncer en aquellos que consumían mayor cantidad de alcohol que en los que lo consumían en menor medida (7). A su vez, en otro estudio de personas con cirrosis relacionada con VHB, el riesgo de cáncer también aumentaba en los casos donde el consumo de alcohol era mayor (8).

Por último, las enfermedades de sobrecarga oxidativa como la enfermedad de Wilson y la hemocromatosis tienen como resultado la generación de especies de oxígeno y nitrógeno que pueden dañar el DNA y provocar mutaciones en el gen supresor de tumores p53, esto mismo

ocurre a el gen X del VHB (HBX) integrado en el huésped que es frecuentemente mutado y conserva la capacidad de unirse a p53, atenuando la reparación del DNA y la apoptosis mediada por p53. En resumen, virus y productos químicos están implicados en la etiología de las mutaciones p53 durante la patogénesis molecular del carcinoma hepático(9)(10).

En las fases tempranas de este cáncer, la enfermedad es potencialmente curable por resección quirúrgica, trasplante de hígado o técnicas no quirúrgicas como son la inyección percutánea de etanol o RFA (ablación por radiofrecuencia) (11). En pacientes en estadios intermedios con cirrosis se recomienda la quimioembolización transarterial (TACE). Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad y el tratamiento más común es la quimioterapia con agentes como doxorubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo. Esta última opción, consiste en la utilización de sustancias citotóxicas que van a actuar sobre las células cancerígenas, pero tiene como inconveniente que también atacan a las células normales entre las que se encuentran las células que forman los folículos pilosos, las células del aparato gástrico etc. Ésto es lo que da lugar a los distintos efectos secundarios generales de la quimioterapia, conocidos por todos como es la caída del pelo y vómitos entre otros. A esta desventaja se suma que estas sustancias citotóxicas no son capaces de permanecer en gran medida en el torrente sanguíneo puesto que son reconocidas por el organismo como sustancias extrañas provocando una activación del sistema retículoendotelial y su prematura eliminación.

La Nanotecnología farmacéutica ofrece una alternativa para resolver los problemas de la quimioterapia convencional anteriormente citados mediante la incorporación del fármaco en transportadores de tamaño nanométrico. Estas partículas presentan una relación superficie/volumen muy beneficiosa, permiten incorporar distintos tipos de fármacos y pequeño tamaño, además de poder incorporar en su superficie distintas moléculas que van a favorecer una terapia dirigida (12). A su vez, permiten la protección del agente terapéutico, especialmente importante cuando se tratan de ácidos nucleicos que son fácilmente degradables, previenen la prematura eliminación por parte de los macrófagos del sistema retículo endotelial (RES), reduce la acumulación del agente terapéutico en tejidos que no sean el hígado, reduciendo así la toxicidad en otros órganos, también promueve la penetración específica en las células del hígado y superan los mecanismos de resistencia a los medicamentos. Hasta la actualidad estas nanopartículas se han desarrollado de diferentes tipos, entre los que encontramos nanopartículas orgánicas, inorgánicas, poliméricas y lipídicas (13).

Las nanopartículas deben de tener un tamaño entre 10-100nm. Si la partícula tiene un tamaño inferior a 10nm se eliminará rápidamente por aclaramiento renal lo cual no sería correcto, por otro lado, si el tamaño es superior a 100nm, el problema lo encontraríamos en que la probabilidad de que la partícula sea reconocida y captada por el RES sería muy elevada (14).

OBJETIVOS

Realizar una revisión sobre los distintos tipos de nanosistemas para el tratamiento del carcinoma hepático, centrándonos en los liposomas como transportadores de los agentes terapéuticos, tanto comercializados como aquellos que se encuentran en fase de estudio.

Profundizar en los tipos de vectorización utilizando sistemas lipídicos para el tratamiento del carcinoma hepático, tanto por vectorización activa como pasiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de distintos artículos encontrados en bases de datos entre las que se encuentran Pubmed, Science direct y ResearchGate entre otras. Algunas de las palabras clave utilizadas para ello fueron; carcinoma hepatocelular, nanopartículas, liposomas, vectorización activa, vectorización pasiva, nanomedicinas, tratamiento, terapia génica, vectorización de fármacos, transportadores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Citostáticos para el tratamiento del hepatocarcinoma y sus principales efectos adversos:

El tratamiento de elección en el cáncer hepático en estadios avanzados es, como se ha indicado anteriormente, la quimioterapia. Esto consiste en la utilización de agentes citostáticos que van a actuar a nivel de las células cancerígenas. En este cáncer en concreto, ha sido ampliamente utilizado el citostático doxorubicina (Adriamycin®) como único tratamiento o en combinación con otros fármacos como talidomida o cisplatino pero la eficacia no es muy elevada. También ha sido utilizada la combinación de doxorubicina con gemcitabina (Gemzar®) cuya eficacia es ligeramente superior pero que actualmente no se comercializa. Otra opción terapéutica es capecitabina (Xeloda®), profarmaco del 5-fluorouracilo pero tiene escasa actividad si se administra de forma independiente. Se observó que su combinación con doxorubicina y cisplatino u oxaliplatino da lugar a una actividad antitumoral más eficaz. También demostró ser eficaz la combinación de capecitabina con

bevacizumab. Fue en noviembre de 2007, cuando se aprobó sorafenib (Nexavar®) como el tratamiento de primera línea para el carcinoma hepático.

Este último citostático, es un inhibidor multiquinasa que reduce la proliferación celular tumoral. Inhibe el crecimiento tumoral y reduce la angiogénesis. Inhibe también la actividad de las dianas presentes en la célula tumoral y en la vasculatura tumoral. Está indicado para cáncer renal y hepático. Tras diversos estudios se ha observado que este fármaco es capaz de aumentar en tres meses la esperanza de vida de pacientes que padecen cáncer hepático.

La quimioterapia convencional presenta una gran problemática; da lugar a muchos efectos secundarios. Ésto es debido a su falta de selectividad y, por tanto, su acción sobre todas las células y no sólo sobre las cancerígenas, dando lugar a efectos secundarios generales como se ha mencionado anteriormente, pero además de los efectos generales, cada citostático presenta efectos adversos concretos. Así, por ejemplo, Andramycin® es conocido por producir radicales libres de oxígeno (ROS) en el corazón produciendo cardiotoxicidad y se ha demostrado su capacidad de oxidación de proteínas y peroxidación lipídica a nivel cerebral lo que puede dar como consecuencia falta de concentración, falta de memoria y mareos.(15) Cuando se habla de Andramycin® combinado con cisplatino, los principales efectos son la toxicidad renal y la cardíaca.(16) En el caso de Xeloda®, a pesar de presentar unos efectos adversos menores por tratarse de un profármaco que no tiene actividad hasta que se activa a nivel de las células tumorales, sí que provoca efectos gastrointestinales y a nivel de la dermis.(17)

Una gran innovación ha sido el uso de transportadores, tanto poliméricos como lipídicos, para los distintos fármacos utilizados en el tratamiento del carcinoma hepático que van a modificar su farmacocinética y la biodistribución, así como reducir los efectos adversos. Este artículo se va a centrar en los liposomas como transportadores de los agentes terapéuticos.

Los liposomas como vectores de fármacos:

Los liposomas son nanopartículas esféricas en las que la separación del medio interno del medio externo consiste en una bicapa lipídica. Al presentar una fracción acuosa y otra lipídica, pueden alojar sustancias hidrofílicas y lipofílicas. Los liposomas se pueden clasificar según su tamaño y el número de bicapas que lo formen. Los que presentan una sola capa lipídica se suelen clasificar según su tamaño; Small Unilamellar Vesicles o vesículas unilaminares pequeñas (SUV) y Large Unilamellar Vesicles o vesículas unilaminares grandes (LUV). Si presentan más de una bicapa, podemos clasificarlos en Oligollamellar Vesicles o

vesículas oligolaminares(OLV) con pocas capas superpuestas y Multilamellar Vesicles o vesículas multilaminares(MLV) con muchas capas superpuestas.

Los fosfolípidos son los lípidos que más se utilizan en la elaboración de liposomas. La variabilidad de éstos radica en el grupo que se une al fosfato. Así, se pueden unir aminoalcoholes (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina), aminoácidos (fosfatidilserina), alcoholes (fosfatidilglicerol) y azúcares (fosfatidilinositol). Dentro de los fosfolípidos, la lecitina (fosfatidilcolina) es la más utilizada, puesto que es fácilmente extraíble de la yema de huevo y de la semilla de soja. También se utiliza colesterol con el fin de reducir la permeabilidad de las bicapas y para aumentar la estabilidad del liposoma.

Se han desarrollado distintas formas para la obtención de los liposomas. Para la preparación de vesículas multilaminares (MLV), se utiliza el método clásico que consiste en la hidratación de la fase lipídica. En el caso de vesículas de una sola capa, el principal método utilizado es el de sonicación el cual consiste en utilizar ondas sonoras para romper las vesículas multilaminares y obtener unilaminares de mayor y menor tamaño, por último se centrifuga para separar y obtener las de pequeño tamaño. Otra forma de obtención de SUV es la inyección con etanol, que consiste en disolver la fase lipídica en etanol que se inyecta en una fase acuosa y se forman las vesículas unilaminares pequeñas. Uno de los métodos usados para la obtención de LUV es incorporar la fase acuosa sobre los fosfolípidos disueltos previamente en un solvente orgánico y posteriormente eliminar el solvente de la fase lipídica. Todos estos métodos descritos están pensados para obtener liposomas a nivel de laboratorio.

A nivel industrial se utilizan otro tipo de técnicas como la de diálisis con detergente que consiste en la retirada continua del detergente de la solución micelar lípido/detergente que conduce de forma espontánea a la formación de liposomas. Otra técnica es la microfluidización que consiste en hacer pasar la emulsión bajo grandes presiones a través de un aparato llamado microfluidizador; la principal ventaja de este método es que la fase en la que se disuelven los fosfolípidos en solventes orgánicos ya no es necesaria. Otro método es el de la burbuja que consiste en la introducción de burbujas de gas en la dispersión lipídica, con esto las vesículas se forman de forma homogénea. Esta última técnica es adecuada para liposomas que vayan a incorporar en su interior sustancias vulnerables como proteínas o que sean incompatibles con solventes orgánicos o detergentes. (18)

El uso de liposomas como transportadores de fármacos supone muchas ventajas entre las que se pueden nombrar; mejoran la solubilidad del agente terapéutico, los protegen de la

degradación, permiten una liberación sostenida del fármaco, mejora las características farmacocinéticas y modifican su biodisponibilidad.(19)

Liposomas para la vectorización de citostáticos a nivel hepático:

Uno de los agentes terapéuticos que se utiliza para el tratamiento del cáncer hepático es la doxorubicina pero tiene una alta toxicidad a nivel cardiaco antes mencionada. Por ello, se realizaron diversos estudios que consistían en administrar el fármaco en el interior de liposomas (DOX-Liposoma) y se demostró que la toxicidad de este fármaco quedaba reducida (20) (21).Esto llevó a la comercialización del agente terapéutico doxorubicina en el interior de liposomas, que es lo que conocemos como Myocil®.

Sin embargo, los liposomas también presentan ciertos problemas, uno de ellos es su rápida eliminación por parte del sistema mononuclear fagocítico, también conocido como sistema retículoendotelial. En la búsqueda de una solución a este problema se desarrollaron los liposomas Stealth, cuya innovación fue la incorporación de un derivado del polietilenglicol (PEG) el cual consigue, lo que se ha denominado como “estabilización estérica” de la nanopartículas, con el fin de conseguir evitar su opsonización y que permanezca más tiempo en circulación sin ser eliminado (22) (23) (24). Esto lo consigue gracias a que apantalla la carga superficial, aumenta la hidrofilia de la superficie y la formación de una capa en la superficie de la partícula que dificulta su captación. (25)

En la actualidad, hay algún tipo de liposomas pegilado cargado con el citostático doxorubicina que se encuentran aprobados por la FDA como el DOXIL®, nanofármaco aprobado en 1995 que presenta ciertas ventajas como son; permanece más tiempo en circulación gracias a que evita el reconocimiento por parte del sistema retículoendotelial por la presencia de PEG en su superficie y carga de doxorubicina dirigida por un gradiente de amonio sulfato el cual permite también la liberación del fármaco en el tumor (26).

Tanto los liposomas clásicos como los Stealth van a conseguir una mayor acumulación de fármaco en el tumor por las propias características anatómicas y fisiopatológicas de éste, es lo que se denomina EPR (efecto de permeación y retención aumentada) (27) que es un tipo de vectorización pasiva. Entre los factores condicionantes de este efecto se encuentran la extensa angiogénesis, la alta densidad vascular de la masa tumoral (28), los defectos de la arquitectura vascular que irriga el tumor, el escaso aclaramiento linfático que produce una mayor retención de la nanopartículas en el espacio intersticial (29), y un lento retorno venoso que origina una mayor acumulación de la nanopartículas (30).Otro tipo de vectorización pasiva sería la

quimioembolización que juega con el tamaño del transportador. El sistema se incorpora a la circulación y avanza por los capilares hasta que el diámetro de estos impide que el transportador avance, quedando retenido y liberando en ese lugar el fármaco. Si queremos que lo libere en el hígado deberíamos administrarlo a nivel de la arteria hepática o la vena porta.

Con el fin de conseguir la llegada y penetración de los liposomas en unas células concretas, se desarrollaron liposomas funcionalizados, que consiste en la incorporación de ciertas moléculas en la superficie del liposoma, que interaccionarán con un receptor concreto de la célula diana. Esto es lo que llamamos vectorización activa. Estas moléculas pueden ser anticuerpos completos o fragmentos de los mismos, de bajo peso molecular, de origen natural o ligandos sintéticos como péptidos, hidratos de carbono, glicoproteínas o ligandos específicos de receptores que se encuentren sobreexpresados o sean específicos de las células cancerosas (31).

Puesto que el carcinoma hepático afecta a los hepatocitos, es conveniente una vectorización activa del liposoma para que actúe selectivamente sobre éstos, disminuyendo así su acción toxica sobre el resto de células sanas. Se ha demostrado que los residuos de lactosa o lactosamina en la superficie de los liposomas favorecen la llegada de éstos a los hepatocitos por la unión al receptor de asiloglicoproteína (ASGP-R1 y ASGP-R2). Este tipo de receptor se encuentra de forma abundante y exclusiva en las células del parénquima hepático (32). ASGP-Rs también reconocen y promueven la endocitosis de glicoproteínas que presenten cadenas con una galactosa terminal o N-acetilgalactosamina. (33) .Se ha observado que en los casos de carcinoma hepático este receptor se encuentra sobreexpresado (34) lo cual ha llevado a plantearlo como un posible camino para la vectorización.

En otro estudio, se llevó a cabo la incorporación de ácido lactobiónico (producto de la oxidación enzimática de la lactosa) a dioleoilfotidiletanolamina (Lac-DOPE), para la vectorización de nanopartículas lipídicas cargadas con docetaxel. Los investigadores observaron el aumento de la actividad citotóxica del docetaxel y, por ello, continuaron la investigación con liposomas cargados con doxorubicina y con el ligando en su superficie (Lac-DOX-Lp). Por último, la eficacia se estudió en ratones a partir de xenoinjertos de células HepG2 (35), obteniéndose resultados positivos como fueron; una mayor captación y acumulación del fármaco por las células tumorales, aumento de su vida útil y disminuía un 81% el crecimiento del tumor, todo ello indica que podrían llegar a ser una nueva forma de presentar el fármaco.

Por otro lado, se han realizados estudios es los cuales la doxorubicina se ha incorporado a liposomas que a su vez han sido marcados con otro tipo de ligando. En el caso anterior era con lactosa, mientras que en este estudio se marcó con un fragmento de anticuerpo monoclonal anti CD44 cuya misión era vectorizar hacia los receptores CD44 de las células cancerígenas e inducir su apoptosis. La incorporación de estos liposomas marcados se testó in vitro en líneas celulares HepG2 lo que permitió comprobar que aumentaba la apoptosis de las células cancerígenas y se reducía la toxicidad del fármaco en el resto de células. Se comparó con la administración del agente terapéutico sin liposoma y se observo que cuando se utilizaba la nanopartícula la acumulación de doxorubicina era siete veces mayor. En este mismo ensayo se realizo el mismo proceso incorporando a los liposomas un plásmido de DNA obteniéndose resultados alentadores que nos hacen pensar que en un futuro la terapia génica permitirá tratar satisfactoriamente numerosas enfermedades. (36)

La doxorubicina también se ha estudiado cargada en liposomas marcados en su superficie con 1-aminolactosa sobre la línea celular AH66. A pesar de que no se conoce el receptor con el que interacciona la 1-aminolactosa, se observo que la incorporación a las células cancerígenas aumentaba y el crecimiento del tumor disminuía. (37)

Como sabemos, el crecimiento del tumor lleva consigo un mayor desarrollo de la vasculatura para poder nutrir a todas las nuevas células tumorales. Las células endoteliales proliferan y aumenta la expresión del receptor 2 del VEGF (factor de crecimiento epitelial) que es propio de este tipo de células lo que hizo pensar en la posibilidad de vectorizar a la zona del endotelio del tumor. Se realizó un estudio en el cual se utilizaron inmunoliposomas, al igual que en el caso anterior, puesto que en la superficie de éstos se situaron fragmentos del anticuerpo monoclonal anti-VEGFR-2. En ellos se introdujo un agente terapéutico que, como en los casos anteriormente citados, fue la doxorubicina. Se observo una mayor acumulación de fármaco, mayor capacidad de internalización y aumento de la inhibición del crecimiento del tumor (38).

Otro de los agentes quimioterápicos que se ha estudiado es la 9-nitrocamptotecina (9-NC) que es un derivado de la camptotecina, potente anticancerígeno gracias a la presencia de un anillo de lactona Pero la 9-NC tiene, según estudios realizados, mayor potencial anticancerígeno. Es un inhibidor de la topoisomerasa I pero sus aplicaciones se veían dificultadas por su baja solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad oral. Se propuso entonces el uso de sistemas que permitiesen solventar estos problemas, encapsulando el principio activo en un liposoma.

Se llevó a cabo un estudio, tanto in vitro como in vivo, en el cual se comparó el efecto de 9-NC-liposoma y 9-NC, en distintas líneas celulares recogidas en la Tabla 1. Con ello, se extrajeron unas conclusiones; el efecto de ambos dependía tanto del tipo de célula sobre el que actuaba como de la dosis a la que se encontraba, ambos inhibían el crecimiento del tumor pero 9-NC-liposoma lo inhibía en mayor medida y presentaba menos efectos adversos, ambos estimulaban p53(gen supresor de tumores, también llamado “el guardián del genoma”) y regulaban la expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular y con la apoptosis incluyendo; p21, p27, Bcl-2, Bax y otras (39).

El paclitaxel es un diterpeno utilizado también como agente citostático que presenta una gran actividad en distintos tipos de tumores, gracias a su acción a nivel de los microtúbulos. Es muy poco soluble en agua lo que exige su administración vía parenteral asociado a excipientes como son el aceite de castor polioxetilado y etanol, produciendo muchos efectos adversos así como reacciones de hipersensibilidad.

Con el fin de mejorar esta situación, se planteó estudiar la administración de este fármaco en el interior de liposomas, realizándose un estudio en el que se comparó el efecto del fármaco sólo y del fármaco en el interior de estos transportadores. Con los resultados obtenidos, se concluyó que la eficacia terapéutica es la misma pero que al utilizar transportadores lipídicos, los problemas de solubilidad mejoraban y el uso del aceite de castor y del etanol se podía evitar, por lo que esta forma de administración del paclitaxel es mucho más adecuada (40). Con la idea de no sólo mejorar su administración sino vectorizar el fármaco al hígado, se realizó un ensayo en el cual se incorporó ácido hialurónico a la superficie del liposoma cargado con paclitaxel. Este ensayo se llevó a cabo in vitro e in vivo, utilizando una línea celular HepG2 procedente de ratones, como se indica en la Tabla 1. Se vio que aumentaba la acumulación de fármaco en las células, aumentaba la inhibición del tumor y mejoraba la citotoxicidad tanto in vivo como in vitro.

Docetaxel es otro citostático que ha mostrado su efecto para el tratamiento del carcinoma hepático in vitro, pero en estudios in vivo no ha tenido resultados satisfactorios debido a que carece de especificidad y selectividad a nivel de células y tejidos (41) (42). Por ello, se propuso estudiar los liposomas como transportadores del fármaco directamente al hígado, e intentar así solucionar el problema. Para ello, se han diseñado unas nanopartículas lipídicas vectorizadas al hígado por la presencia de dioleoilfosfatidiletanolamina galactosilada(Gal-DOPE). Se observó que la citotoxicidad de estas partículas vectorizadas y cargadas con el fármaco frente a la línea celular BEL 7402 era mayor que cuando se utilizaba el fármaco sólo

(TAXOTERE®) o las nanopartículas pero sin el ligando incorporado y esto se debía a la mayor incorporación del fármaco a las células diana y una mayor acumulación (43). A pesar de los resultados satisfactorios esta formulación se encuentra aún en estudio, en fase II/III.

Con este citostático orientado al tratamiento del carcinoma hepático, se han realizado otros estudios en los que se han ido probando distintos ligandos. Se ha observado que el ácido glicirretínico (GA) presenta puntos de unión en la membrana de los hepatocitos de ratas. Esto llevó a plantear un liposoma vectorizado con esta molécula en su superficie GA-DX-Lip.

Al comparar DX-Lip con GA-DX-Lip se observó mayor afinidad por el hepatocito cuando presentaba GA en su superficie consiguiendo una mayor cantidad de fármaco que llegaba a las células HepG2. Desde el punto de vista farmacocinético no presentaban grandes diferencias (44).

A pesar de que el docetaxel y el paclitaxel, anteriormente citados pertenecen al mismo grupo de citostáticos, se ha comprobado que el efecto del docetaxel es superior al del paclitaxel. (45).

Gran interés tiene mencionar otra estrategia como es ThermoDox. Consiste en un liposoma termosensible cargado con doxorubicina que, como ya hemos indicado, es un citostático muy utilizado para el tratamiento del cáncer hepático. Está formado por 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1-estaroil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (MSPC) y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-metoxipolietilenglicol-2000(DSPE-mPEG-2000).

En este sistema, la liberación del fármaco es por calor gracias al DPPC que, con el aumento de la temperatura, forma aberturas en el liposoma permitiendo que se libere el fármaco, mientras que la incorporación de MSPC ayuda a reducir la temperatura de transición de sólido a líquido del liposoma. Tras una administración intravenosa, ThermoDox se acumula de forma pasiva en el hígado y libera su contenido cuando se alcanza una temperatura de $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$, por ello es una técnica que se utiliza en combinación con tratamientos de hipertermia es decir, a base de calor, como es la ablación por radiofrecuencia térmica (RFA) o la hipertermiamicroondas y de alta intensidad de ultrasonidos focalizados (HIFU). Esto crea un gradiente de alta concentración de doxorubicina que es capaz de matar las células residuales tumorales.

El objetivo del enfoque ThermoDox es ampliar la zona de tratamiento eficaz de estas tecnologías para capturar las micrometástasis, que son más comúnmente responsables de la recurrencia de la enfermedad después del tratamiento. Por ejemplo, en pacientes con cáncer

primario de hígado, hay una muy alta tasa de recurrencia de un año en el área inmediata de la región sometida a ablación originales; abordar esta área expandida como parte del régimen de tratamiento puede reducir potencialmente las tasas de recurrencia y mejorar los resultados del paciente.

Celsion , que es una compañía que se dedica al estudio y desarrollo de nuevos tratamientos para el cáncer, ha recibido recientemente el visto bueno por parte de la FDA para iniciar el ensayo OPTIMA Fase III, que está diseñado para evaluar Thermodox en combinación con la RFA estandarizada (SRFA 45) en el cáncer primario de hígado. El estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo reclutará a aproximadamente 550 pacientes de América del Norte, Europa, China y otras zonas de Asia y el Pacífico.

Lo que se quiere valorar de forma principal es la supervivencia global, y el estudio tiene como objetivo demostrar una mejora del 33% en ésta. El diseño del estudio OPTIMA se apoya en un análisis retrospectivo de un gran subgrupo de 285 pacientes en un ensayo previo de fase III en el cáncer primario de hígado. En un subgrupo de 285 participantes en el estudio Calor de julio de 2014, se ha observado una mejora del 57% en la supervivencia global en el Thermodox + RFA, en comparación con los que recibieron RFA sólo. El análisis sugiere que una mejora del 33% en la supervivencia global es un objetivo alcanzable para el estudio OPTIMA. A partir de julio de 2015, los pacientes que recibieron un procedimiento optimizado RFA, que fueron 285 pacientes, mostraron una mejora promedio del 58% en la supervivencia global.(46)

Otro tipo de sistema que ha sido estudiado para el tratamiento del carcinoma hepático ha sido la utilización de un lípido que se va a escindir por la actividad proteasa de la enzima metalproteínasa de matriz 2 (MMP-2). El grupo amino del dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) se conjugó con el sustrato peptídico de esta proteasa (Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln) que a su vez estaba pegilado (con PEG), obteniéndose así PEG-PD. Cuando PEG-PD se incorporó a unos liposomas previamente marcados con galactosa se obtuvo Gal-PEG-PD-liposomas y fueron éstos lo que se llevaron a estudio.

Se esperaba que Gal-PEG-PD-liposomas no serían incorporados por los hepatocitos normales, pero que sí lo harían por las células cancerosas debido a la síntesis y secreción de metaloproteinasas (MMPs) por parte de éstas. Estas enzimas consiguen la escisión de PEG-PD lo que permite observar una mayor absorción de los liposomas por células HepG2. Además se observó que si se administraban en presencia de un exceso de galactosa, la absorción de estos liposomas a pesar de la presencia de las enzimas, disminuía

significativamente. Esto sugiere que la vectorización de los liposomas se consigue gracias a la galactosa de su superficie que se une al receptor de asialoglicoproteína. Además, la citotoxicidad del agente utilizado que fue de N4-octadecil-1-β-D-arabinofuranosilcitosina (NOAC) aumentaba cuando se administraba en el interior de este sistema liposomal. En conclusión, con este estudio podemos decir que se ha desarrollado una nueva forma de orientación selectiva para el tratamiento del carcinoma hepático. A pesar de los buenos resultados, aún no se encuentra comercializado sino en fase preclínica (47).

Tabla 1: Distintos liposomas estudiados para el tratamiento del carcinoma hepático

	Liposoma	Citostático	ligando	Receptor	Fase	Línea celular
Vectorización pasiva	Myocil	Doxorubicina	-	-	Comercializado	
	Doxil	Doxorubicina	-	-	Comercializado	
	ThermoDox	Doxorubicina	-	-	III	
	9-NC-Lp	9-NC	-	-	II/III	HepG2,BEL 7402 Hep 3B,L02
Vectorización activa	DOX-Lp	Doxorubicina	lactosa	ASGPR	preclínica	HepG2
	DOX-Lp	Doxorubicina	CD44	CD44+	preclínica	HepG2
	DOX-Lp	Doxorubicina	Anti-VEFG	VEFG	preclínica	BNL
				receptor 2		
	DX-Lp	Docetaxel	Ácido glicirricínico	No determinad	preclínica	HepG2
	DX-Lp	Docetaxel	Galactosa	ASGPR	II/III	BEL 7402
	PX-Lp	Paclitaxel	Ácido hialurónico	No determinad	preclínica	HepG2
	NOAC-Lp	NOAC	Galactosa	ASGPR	preclínica	HepG2
	Dox-Lp	Doxorubicina	1-Aminolactosa	No determinad	preclínica	AH66

Terapia génica como otra alternativa de tratamiento:

Debido a la gran importancia que ha ganado en los últimos años, es necesario mencionar la terapia génica como forma experimental de tratamiento tanto de enfermedades genéticas hereditarias como de procesos adquiridos tal como el cáncer, las enfermedades infecciosas o los procesos degenerativos. Se basa en la introducción de nuevo material genético dentro de una célula para conseguir un beneficio terapéutico. Para ello, se pueden introducir en la célula blanco diferentes estructuras constituidas por ácido desoxirribonucleico (ADN), como plásmidos y oligonucleótidos o ácido ribonucleico (ARN), como ribozimas, ARN de interferencia y oligonucleótidos, entre otras.

Para introducir ácidos nucleicos en la célula se pueden utilizar vectores virales y no virales. Dentro de los no virales encontramos los liposomas los cuales no presentan especificidad para ningún tipo celular y su entrega de material génico es mucho menos eficaz que la mediada por virus. No obstante, algunos liposomas se pueden dirigir mediante la modificación de sus lípidos de pared o por su acople a sustancias, como la vitamina A, o a fragmentos de anticuerpos (immunoliposomas).

Se ha logrado así, utilizar material génico terapéutico para patologías como fibrosis quística, carcinoma hepatocelular, melanoma y psoriasis, entre muchas otras. Entre las modalidades terapéuticas encontramos; el uso de genes suicidas que sensibilizan a las células trasducidas frente fármacos que no son tóxicos para el resto de las células del organismo, la potenciación de la respuesta inmune antitumoral mediante la transferencia de genes de citoquinas, combinación citoquinas-quimiocinas, moléculas co-estimuladoras o terapia celular adoptiva con células modificadas genéticamente ex vivo. Otras modalidades son; la inhibición de la acción de oncogenes mediante secuencias antisentido o ribozinas, el restablecimiento de la actividad de genes supresores de tumores y la transferencia de genes con efecto antiangiogénico.

Entre los genes denominados suicidas el mejor caracterizado es el gen de la timidina quinasa perteneciente al virus Herpes Simplex (HSV-tk) que transforma el ganciclovir (GCV) en un compuesto trifosforilado que actúa como un terminador de cadena sobre la síntesis del ADN paralizando la replicación y provocando la muerte celular. Un problema importante que limita la utilización de este tipo de terapia es el daño que experimentan también los hepatocitos normales lo que puede acarrear hepatotoxicidad considerable.

Una formulación liposomal que actualmente se encuentra iniciando estudios clínicos en fase I, es Atu-027, construido a partir de lípidos catiónicos pegilados, indicado para el tratamiento de tumores sólidos. La molécula de siRNA en este caso está diseñada para la inhibición de la proteína quinasa N3 (PKN-3), la inhibición del mecanismo de esta proteína está asociado con varios mecanismos antiangiogénicos. (48)

Como se ha comentado, una de las modalidades es el restablecimiento de la actividad de genes supresores de tumores. Se sabe que este gen está ausente en muchos tumores. Muchos ensayos se centran en la inserción del gen p53 para producir la apoptosis o detener el crecimiento tumoral.

Los estudios clínicos de terapia génica propuestos, o los protocolos, necesitan ser aprobados por al menos dos consejos de revisión en la institución de los investigadores antes

de que se puedan implementar. Los protocolos de terapia génica necesitan también estar aprobados por la FDA, la cual regula todos los productos de terapia génica en EEUU mientras que en Europa hablamos de la EMA.

CONCLUSIONES

Tras la realización de esta revisión de los distintos sistemas lipídicos para el tratamiento del carcinoma hepático, podemos decir que es un área para la cual no hay casi sistemas que se encuentren actualmente comercializados pero está siendo muy investigada debido a la alta prevalencia de la enfermedad. La mayoría de los estudios nombrados están teniendo resultados satisfactorios lo que nos hace pensar que dentro de unos años podremos encontrar en el mercado nuevas formas de tratamiento del carcinoma hepático muy específicas y que conseguirán muchos menos efectos adversos, así como una mayor calidad de vida para el paciente oncológico. Además, el campo de la salud es uno de los más beneficiados con el desarrollo de la biología molecular. En particular, la terapia génica se muestra como una de las opciones terapéuticas que puede revolucionar la forma tradicional de tratar muchas enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Asmaa Ibrahim Gomaa, Shahid A Khan, Mireille B Toledano, Imam Waked, Simon D Taylor-Robinson. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis.
- 2- Alan P. Venook, Christos Papandreou, Junji Furuse, Laura Ladrón de Guevara. The Incidence and Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: A Global and Regional Perspective
- 3- Massimo Colombo, M.D., Roberto de Franchis, M.D., Ersilio Del Ninno, M.D., Angelo Sangiovanni, M.D., Cristina De Fazio, M.D., Maurizio Tommasini, M.D., M. Francesca Donato, M.D., Anna Piva, M.D., Valerio Di Carlo, M.D., y Nicla Dioguardi, M.D. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis.
- 4- Sahil Mittal, and Hashem B. El-Serag. Epidemiology of HCC: Consider the Population
- 5- Goodgame B, Shaheen NJ, Galanko J, El-Serag HB. The risk of end stage liver disease and hepatocellular carcinoma among persons infected with hepatitis C.
- 6- Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women.

- 7- Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. 1991;350:429–431.
- 8- Qian GS, Ross RK, Yu MC, et al. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3:3–10.
- 9- S P Hussain, J Schwank, F Staib , X W Wang¹ and C C Harris. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer.
- 10- Xin W Wang, S.Perwez Hussaina, Teh-Ia Huoa, Chuan-Ging Wua, Marshonna Forguesa, Lorne J Hofseth, Christian Brechot^b, Curtis C Harris^a.Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma.
- 11- Myron Schwartz, Sasan Roayaie and Manousos Konstadoulakis .Strategies for the management of hepatocellular carcinoma.
- 12- Xiaoyang, William Ho, Xueqing Zhang, Nicolas Bertrand,Omid Farokhzad. Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy.
- 13- Lanjuan Li,Huaying Wang,Zhan Yuin Ong,Kaijin Xu,Pui Lai Rachel Ee,Shusen Zheng, James L. Hedrick,Yi-Yan Yang. Polymer and lipid based nanoparticle therapeutics for the treatment of liver diseases.
- 14- Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:771–782.
- 15- GururajJoshi,Rrukhsana Sultana, Jitbanjong Tangpong , Marsha Paulette cole , Daret k. stclair , Mary Vore , Steven Estus, & D. Allan Butterfield. Free radical mediated oxidative stress and toxic side effects in brain induced by the anti cancer drug adriamycin: Insight into chemobrain.
- 16- Masahiko Satoh, Akira Naganuma, Nobumasa Imura. Metallothionein induction prevents toxic side effects of cisplatin and adriamycin used in combination.
- 17- Saif, Muhammad Wasifa; Katirtzoglou, Nikos A.b; Syrigos, Kostas N. Capecitabine: an overview of the side effects and their management.
- 18- Watwe RM, Bellare JR. Manufacture of Liposomes - a Review. *Curr Sci*. 1995;68:715–724.

- 19- Theresa M. Allen. Liposomal Drug Formulations Rationale for Development and What We Can Expect for the Future. Department of Pharmacology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
- 20- Gabizon A, Dagan A, Goren D, Barenholz Y, Fuks Z. Liposomes in vivo carriers of adriamycin: reduced cardiac uptake and preservative tumor activity in mice. *Cancer Res.* 1982;42:4734–4739.
- 21- T. Safra, F. Muggia, S. Jeffers, D. D. Tsao-Wei, S. Groshen, O. Lyass, R. Henderson, G. Berry and A. Gabizon. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): Reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m².
- 22- Allen TM, Chonn A. *FEBS Lett.* Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. 1987;223:42–6.
- 23- T. M. Allen, A. Gabizon, E. Mayhew, K. Matthey, S. Kk. Huang, K.-D. Lee, M. C. Woodle, D. D. Lasic, C. Redemann, and F.J. Martin. Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy.
- 24- Alexander L. Klibanov, Kazuo Maruyama, Vladimir P. Torchilin and Leaf Huang. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes
- 25- Vladimir P. Torchilin. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging .Department of Pharmaceutical Sciences and Center for Pharmaceutical Biotechnology and Nanomedicine, Northeastern. University, Boston.
- 26- Yechezkel (Chezy) Barenholz .Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. Laboratory of Membrane and Liposome Research, Institute of Medical Research Israel–Canada (IMRIC), The Hebrew University–Hadassah Medical School.
- 27- Martínez-Soler GI, Pérez-Artacho B, Sáez-Fernández E, Gallardo V, Arias JL. Drug delivery strategies based on the enhanced permeation and retention effect. *Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia de Granada.*
- 28- Jan RK. *Cancer Metastasis Rev* 1987;559–93.
- 29- Kukowska-Latallo JF, Candido KA, Cao Z, Nigam SS, Majoros IJ, Thomas TP, Balogh, LP, Khan MK, Baker JR. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 5317-5324.

- 30- Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, Schmitt-Sody M, Pahernik SA, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *Int. J. Cancer* 2003; 105: 561-567.
- 31- Willis M, Forssen E. Ligand-targeted liposomes. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;29: 249e71
- 32- Y. Cao, Y. Gu, H. Ma, J. Bai, L. Liu, P. Zhao, et al., Self-assembled nanoparticle drug delivery systems from galactosylated polysaccharide–doxorubicin conjugate loaded doxorubicin, *Int. J. Biol. Macromol.* 46 (2010) 245–249,
- 33-M. Cheng, Z. Liu, T. Wan, B. He, B. Zha, J. Han, et al., Preliminary pharmacology of galactosylated chitosan/5-fluorouracil nanoparticles and its inhibition of hepato-cellular carcinoma in mice, *Cancer Biol. Ther.* 13 (2012) 1407–1416.
- 34-Y.-M. Li, S.-C. Xu, J. Li, K.-Q. Han, H.-F. Pi, L. Zheng, et al., Epithelial–mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease, *Cell Death Dis.* 4 (2013) e831.
- 35- X.Zhou,M.Zhang,B.Yung,H.Li,C.Zhou,L.J.Lee,et al.,Lactosylated liposomes for targeted delivery of doxorubicin to hepatocellular carcinoma, *Int.J.Nanomedicine* 7 (2012)5465-5474.
- 36- Lina Wang, Weijun Su, Ze Liu, Manqian Zhou, Si Chen, Yanan Chen, Dan Lu,Yan Fan, Yizhou Zheng, Zhongchao Han, Deling Kong, Joseph C. Wu, Rong Xiang, Yanhua Liu, Zongjin Li. CD44 antibody-targeted liposomal nanoparticles for molecular imaging and therapy of hepatocellular carcinoma.
- 37- M. Yamamoto, K. Ichinose,N.Ishii,T.Khoji,K. Akiyoshi,N. Moringuchi, te al., Utility of liposomes coated with polysaccharide bearing 1-amino-lactose as targeting chemotherapy for AH66 hepatoma cells, *Oncol. Rep.* 7 (2000). [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601602](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601602)
- 38- Patrik Rotha, Caroline Hammera, Anne-Christine Piguetb, Monika Ledermannb, Jean-François Dufourb & Ernst Waelti. Effects on hepatocellular carcinoma of doxorubicin-loaded immunoliposomes designed to target the VEGFR-2
- 39-Shunzhen Zheng, Shuang Chang, Jinli Lu, Zhihui Chen, Li Xie, Yu Nie,BinHe,Zhongwei Gu, Shengquan Zou. Characterization of 9-Nitrocamptothecin

Liposomes:Anticancer Properties and Mechanisms on Hepatocellular Carcinoma,In Vitro and In Vivo.

40- F. Lacoeyille, F. Hindre, F. Moal, J. Roux, C. Passirani, O. Couturier,P. Cales, J.J. Le Jeune, A. Lamprecht, J.P. Benoit. In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel

41- Geng CX, Zeng ZC, Wang JY. Docetaxel inhibits SMMC-7221 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. World J Gastroenterol 2003;9:696–700.

42-Lin HL, Liu TY, Chau GY, Lui WY, Chi CW. Comparison of 2-methoxyestradiolinduced, docetaxel-induced, and paclitaxel-induced apoptosis in hepatoma cells and its correlation with reactive oxygen species. Cancer 2000;89:983–94.

43- Zhenghong Xu, Lingli Chen, Wangwen Gu, Yu Gao, Liping Lin, Zhiwen Zhang, Yong Xi, Yaping Li. The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma

44- Jie Li, Haie Xu, Xue Ke, and Jilai Tian The anti-tumor performance of docetaxel liposomes surface-modified with glycyrrhetic acid.

45- http://celsion.com/docs/technology_thermodox

46-Takeshi Terada, Mieko Iwai, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida. Novel PEG-matrix metalloproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting

47- José Luis Vila Jato Giovanna Lollo, Gustavo Rivera-Rodriguez, Dolores Torres, Maria José Alonso. Nanoterapias oncológicas: aplicaciones actuales y perspectivas futuras